

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT VON
PROTEASEN AUS „PSEUDOMONAS AERUGINOSA“
UND DEREN HEMMBARKEIT DURCH
NATÜRLICHE PROTEINASE-INHIBITOREN**

Otto Brandl

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER HALS-, NASEN- UND OHRENKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

UNTERSUCHUNGEN
ZUR PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT VON PROTEASEN AUS
"PSEUDOMONAS AERUGINOSA" UND DEREN HEMMBARKEIT
DURCH NATÜRLICHE PROTEINASE-INHIBITOREN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
O t t o B r a n d l
aus Augsburg

München 1975

Mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. K. Hochstrasser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 1975



INHALT

I. Einleitung

Einleitung des Herausgebers

II. Die Sammlung

- Einführung

- Zusammenfassung

- **MEINER LIEBEN MUTTER GEWIDMET**

III. Die Sammlung

- Einführung

- Zusammenfassung

IV. Die Sammlung

- Einführung

- Zusammenfassung

- Zusammenfassung

- Zusammenfassung

V. Die Sammlung

- Einführung

- Zusammenfassung

- Zusammenfassung

Verzeichnis der Sammlungen und der Sammler

1. Einleitung

2. Die Sammlung

Die Sammlung der Sammlungen

Die Sammlung der Sammlungen

Die Sammlung der Sammlungen

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A EINFÜHRUNG

Geschichte des Krankheitsbegriffes

Die Entzündung

- Definition
- Symptome
- Auslösende Faktoren

Die Bakterien

- Definition
- Aufbau

Die bakterielle Infektion

- Entstehung
- Ablauf
- Toxinproduktion
- Enzymproduktion

Die Bakterien-Enzyme

- Enzymdefinition
- Amidasen
- Proteinasen

Infektion und Proteasenfunktion im Krankheitsverlauf

B HAUPTTEIL

Themastellung

Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* als Proteasenquelle

- Nomenklatur

- *Pseudomonas aerug.* in der Literatur
- Mikrobiologie des Bakteriums
- Verbreitung
- Pathogenität und Virulenz
- Beziehungen zur Proteasenproduktion

Inhibitorauswahl

- Gründe
- Definition der natürl. Proteinaseninhibitoren

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Untersuchungsmaterialien

- Proteasen
 - Herkunft
 - Gewinnung
- Inhibitorenauswahl
 - Seren vom Menschen
 - Einzelne Serum-inhibitoren
 - α_1 -AT
 - α_1 -X
 - I- α -I
 - α_2 -M
 - Bronchialsekret-Inhibitor
 - Inhibitor der Glandula Submandibularis v. Hund
 - Pflanzl. Inhibitoren
 - Roggeninhibitor
 - Weizeninhibitor
 - Polyvalenter Rinderorgan-Inhibitor
 - Tierseren
 - Schwein
 - Rind

Untersuchungsmethoden

- Bestimmung der Hemmkapazität der Inhibitoren im Antitrypsintest (BAPA)
- Proteasenaktivitätstest mit Azokasein
 - Aktivitätstest bei wechselnden pH-Werten
- Proteasenhemmtests mit Azokasein
- Bestimmung der α_2 -M Konzentration der Seren durch radiale Immundiffusion

D ERGEBNISSE

- Bewertung von pH-Wert-Änderungen
- Hemmwirkung der einzelnen Inhibitoren
- Abhängigkeit der Hemmwirkung von Seren vom α_2 -Makroglobulin-Gehalt
- α_2 -M-Spiegel bei Pyocyaneus-Infektion

E DISKUSSION

Vergleich der eigenen Ergebnisse mit bereits bestehenden Untersuchungen über die Funktion natürlicher Proteinase-Inhibitoren

- Hemmechanismus von α_2 -M
- Funktion bereits bekannter Inhibitoren im Bronchial-Nasen-Bereich
- Einordnung von α_2 -M und Aufgabenbereich
- Aktionsradius von α_2 -M
- Antiproteinase - Therapie

F ZUSAMMENFASSUNG

G LITERATURVERZEICHNIS

A E I N F Ü H R U N G

Bereits die frühe Geschichte dokumentiert die Entwicklung einer Heilkunde. Ihr Anlaß, die Krankheit, ist bis in die moderne Medizin ein zentraler Begriff geblieben. Die Versuche, eine gültige Definition dieses Begriffes zu geben, lassen sich zurück verfolgen bis zu Geist-haften Vorstellungen der Krankheit. Weitere wichtige Stationen wurden die Lehren der Humoral- und Solidarpathologie, wie sie Hippokrates (460 - 377) und Galen (ca. 131 - 200) vertreten haben. Neue Vorstellungen, deren Gültigkeit auch heute anerkannt ist, brachte erst Paracelsus (1493 - 1541). Er definierte Krankheit als "natürliche Lebensäußerung des Organismus". Die Erforschung dieser Funktionen ist Aufgabe der modernen Biologie. Morgagni (1681 - 1771) hat auf gestaltlich faßbare Organveränderungen hingewiesen und etwas später folgten die Beobachtungen Virchow's (1821 - 1902) über Veränderungen der Zellen und Zell-zwischensubstanzen. Diese Veränderungen, Antwortreaktionen des Gesamtorganismus auf Reize, dienen der Erhaltung eines biologischen Gleichgewichts und haben die Funktion eines Regulationsmechanismus. (3)

DIE ENTZÜNDUNG

Einer dieser Regulationsmechanismen ist die Entzündungsreaktion. Durch sie beantwortet der Körper einen Großteil der pathogenen Umweltreize. Sie ist, wie HAMPERL sie definiert, die Summe aller am Gefäßbindegewebsapparat sich abspielenden exsudativen und proliferativen Vorgänge, die durch die Anwesenheit von verschiedenen Schädlichkeiten ausgelöst werden. Diese Vorgänge äußern sich in vier Eigenschaften des akut entzündeten Gewebes, die allgemein als die vier Kardinalsymptome bezeichnet werden: 1. Rubor, 2. Tumor, 3. Calor, 4. Dolor. Diese bereits von dem Römer CELSUS (ca. 30 v. bis 50 n. Chr.) festgestellten Symptome wurden durch ein weiteres von GALEN (ca. 131 - 200), einem griechischen Arzt, ergänzt. Er fügte die "Functio laesa" hinzu, die gestörte Funktion der betroffenen Körperregion. Jedoch müssen sich nicht immer alle diese Symptome nachweisen lassen. (14)

Die zentrale Stellung der Entzündung in der Pathologie weist auch auf ihren Vorstufencharakter zu oft schweren Krankheitsbildern hin. Als auslösende Faktoren kommen gesetzte Reize verschiedenster Genese in Frage.

Nach BETHMANN kann die Reizung chemischer, thermischer und traumatischer Art sein, sie kann in Strahleneinwirkungen und Zirkulationsstörungen bestehen, im wesentlichen wird sie jedoch durch Infektion mit

pathogenen Keimen verursacht, die auf verschiedenen Wegen in den Körper gelangen. (2)

Aus dieser Zusammenstellung entzündungserregender Faktoren soll uns hier der letzte, sehr wichtige Faktor weiter beschäftigen.

DIE BAKTERIEN

Die Bakterien, auch Schizomyketen oder Spaltpilze genannt, zählen wie die Pilze zu den pflanzlichen Parasiten. Man unterscheidet die reinen Saprophyten von fakultativ und obligat pathogenen Keimen. Die Bakterien bestehen aus ihrer Zellmembran, dem Ektoplasma, und einem protoplasmatischen Inhalt, dem Entoplasma. Ein eigentlicher Kern mit Chromosomen-Formenwechsel fehlt. Es lassen sich aber unterschiedene Strukturen nachweisen, die Thymonukleinsäure enthaltenden Nukleole. Diese sind feulgenpositive, korpuskuläre Elemente. In ihrer äußeren Form sind Bakterien, unter strenger Nomenklatur, Stäbchen, die keine Endosporen bilden, während man unter Bacillen Stäbchen mit Endosporenbildung versteht. Daß auch nicht stäbchenförmige Keime zu den Bakterien gerechnet werden, hat sich aus einer Erweiterung des Bakterienbegriffs ergeben. (13)

DIE BAKTERIELLE INFEKTION

Die Verbreitung der Bakterien ist außerordentlich groß. Sie können in anderen erkrankten Individuen leben, in der Außenwelt und auf den äußeren und inneren Oberflächen des menschlichen Körpers und so zu einer ausgedehnten Übertragung führen. Dringen sie in den Körper ein, resultiert eine Infektion. Durch bestimmte Erreger werden bestimmte Krankheiten hervorgerufen; diese Feststellungen gehen auf die Untersuchungen Robert KOCH's (1843 - 1910) zurück, der eine Reihe von Infektionskrankheiten aufklären konnte. Die Infektionswege, auf denen Bakterien in den Organismus eindringen, gliedert HAMPERL in sechs Möglichkeiten. Er nennt:

- a) den Weg über den Verdauungstrakt,
- b) den Weg über den Respirationstrakt,
- c) über die Poren der äußeren Haut oder über eine Wunde
- d) über Wunden an inneren Organen,
- e) über die Harnröhre und schließlich
- f) über die Placenta, auf den Embryo übertragen.(14)

Die Auswirkungen von Bakterien im Körper und die zu beobachtenden Krankheitsbilder sind vielfältig. Sie können leicht verlaufen oder auch schwere Infektionsformen annehmen, wie sie unsere Untersuchungen zum Ausgangspunkt hatten.

Durch die zuerst erfolgende Vermehrung der Bakterien kommt es zu einer lokalen Infektion. Von hier aus können bakterielle Toxine ins Blut ausgeschwemmt werden, was zur Toxinämie führt. Stammen die Toxine von Fäulniserregern, so handelt es sich um eine Saprämie. Gelangen die Bakterien selbst ins Blut und führen sie zu einer generalisierten Aussaat, ohne aber Veränderungen an inneren Organen zu bewirken, liegt eine Bakteriaemie vor. Sie ist zu trennen von der Sepsis, wo von Bakterien produzierte Toxine neben den Bakterien in der Blutbahn kreisen. Kommt es zur Absiedelung der Erreger und zum Befall innerer Organe, liegt eine Pyämie vor, bereits ein schweres Krankheitsbild.

Diese Toxinabgabe ist die wesentlichste Schädigung, die der Organismus durch das Bakterium erfährt. Sie beruht auf der Bildung von Ektotoxinen, Stoffwechsel- oder Ausscheidungsprodukten der Bakterien, oder auf der Wirkung von Endotoxinen, von im Bakterienleib enthaltenen Stoffen, die bei der Autolyse des Keimes freigesetzt werden. Der Körper beantwortet die Toxinschädigung mit der Bildung von spezifischen Antikörpern, die die Toxine binden, neutralisieren, sie auflösen oder abbauen können. Die Bakterien selbst werden von Leukozyten durch Phagozytose vernichtet. (14)

Zu den Ektotoxinen der Bakterienzelle zählen auch Substanzen, deren Wirkung nicht auf toxischer Basis beruht, sondern die fermentativ im Wirtsorganismus tätig werden. Es handelt sich um die Enzym-Produktion

der Bakterien, die immer mehr an Bedeutung gewinnt. Sie ist auch das Thema unserer Untersuchungen und soll uns im weiteren beschäftigen.

DIE BAKTERIEN-ENZYME

Bevor die einzelnen Enzyme beschrieben werden, soll noch auf die Definition des Begriffes und einige allgemeine Vorbemerkungen eingegangen werden. Unter Fermenten, oder Enzymen, werden Stoffe verstanden, die in der lebendigen Zelle als Katalysatoren nach den Gesetzen der Thermodynamik wirken. Sie katalysieren alle chemischen Umsetzungen im Organismus und der gesamte Stoffwechsel beruht auf ihrer Anwesenheit und Funktion. Ihrer stofflichen Natur nach sind Enzyme zu den Proteinen oder Proteiden zu rechnen mit reversibel oder irreversibel gebundener "prosthetischer Gruppe". Die katalytische Funktion beruht auf bestimmten Teilen der Polypeptidkette, die sich durch eine besondere Faltung zum "aktiven Zentrum" des Enzyms formen. An diesem aktiven Zentrum kommt es zu einer Anlagerung des vom Enzym umzusetzenden Stoffes, des Substrates. Wird das Enzym denaturiert, wird seine Konformation zerstört und damit seine Wirksamkeit. Die Aminosäuresequenz des Proteinanteils braucht deshalb nicht verändert zu sein. Das Enzym besitzt eine im Proteinanteil lokalisierte Substratspezifität,

die in zahlreichen Fällen durch eine Wirkungsspezifität ergänzt wird. Das Enzym katalysiert also nur eine von vielen thermodynamisch möglichen Umwandlungen eines Stoffes. Die Bedingungen für eine optimale Enzymaktivität sind eine Sättigung mit Substrat, ein für jedes Enzym spezifisches pH-Optimum und in vielen Fällen die Anwesenheit von Aktivatoren. (27) Auf der anderen Seite spielt die "Vergiftung" und besonders die Hemmung von Enzymen eine entscheidende Rolle.

Von den Bakterien werden, nach HALLMANN, nun zwei Gruppen solcher Enzyme gebildet. Als erstes nennt er die Gruppe der Amidasen. Ein Beispiel dafür ist die Arginase, die, im Kreislauf der Ammoniakverarbeitung des Bakteriums, Arginin in Ornithin und die tautomere Form des Isoharnstoffes spaltet.

Die zweite Fermentgruppe sind die Proteasen. Sie sind in der Lage, als hydrolytisch wirkende Enzyme, Peptidbindungen zu spalten. Diese proteolytischen, den Eiweißabbau einleitenden Enzyme werden noch unterteilt in Peptidasen, die praktisch identisch sind mit den Exopeptidasen und von den Enden der Aminosäurekette her auf kleinere Bruchstücke, auf Oligo- und Polypeptide einwirken - und in die Proteinasen, die als Endopeptidasen die Proteine und höheren Polypeptide an bestimmten Stellen in der Mitte der Kette angreifen. Der Grund dafür ist, daß Proteasen, im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen Substratspezifitätsverhalten der Enzyme, nicht spezifisch für bestimmte

Proteine sind, sondern spezifisch für bestimmte Aminosäurereste innerhalb der Proteinketten. (27)

INFEKTION UND PROTEASENFUNKTION

Bei der bakteriellen Infektion spielen neben den Toxinen, deren Funktion bereits diskutiert wurde, die Enzyme eine bedeutende Rolle. So läßt die Staphylokokken-Koagulase einen, den Bakterienherd vor Abwehrstoffen und Medikamenten schützenden Fibrinwall entstehen. Andererseits beschleunigen sie, wie auch Pneumo- und Streptokokken, ihre Ausbreitung im Gewebe durch die Produktion von Hyaluronidase. Eine ähnliche "Invasionsunterstützung" erfolgt durch die Streptokinase der Streptokokken, sowie durch Hämolysine und Leukozidine, die Blutzellen, vermutlich auch Leukozyten und Gewebezellen aufzulösen vermögen. In diesem Sinn sprechen auch BETHMANN und BIENENGRÄBER im Zusammenhang mit der Abszedierung bei einer pyogenen Entzündung von einer "proteolytischen Gewebseinschmelzung" mit Eiteransammlung in den entstandenen Gewebslücken, die in der Haut, der Schleimhaut, oder in den tieferen Gewebeschichten sowie Organen und Knochen lokalisiert sein kann. Es ist sicher richtig, diese Gewebseinschmelzungen auf die Funktion bakterieller Proteasen zurückzuführen. In der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde sowie der Zahnheilkunde ist ein besonders auffallendes Wegschmelzen von

Gewebe unter der Einwirkung einer Infektion mit dem Bakterium "*Pseudomonas aeruginosa*" zu beobachten. Den Zusammenhang macht hier besonders deutlich, daß dieses Bakterium erhebliche Mengen äußerst aktiver Proteasen produziert, deren pH-Optima im physiologischen Bereich liegen. So entstehen erhebliche lokale Gewebedefekte, die umso ausgedehnter werden, je schwerer der Krankheitsverlauf ist.

B H A U P T T E I L

THEMATIK

Aus dem Vorangegangenen ergeben sich unter anderem die folgenden Fragen, die der Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen sind:

1. Wie läßt sich die Aktivität der bakteriellen Proteasen darstellen?
2. Welche möglichen Inhibitoren kommen für eine Hemmung in Frage?
3. Wie wirken diese Inhibitoren auf die proteolytische Aktivität der Fermente?

DAS BAKTERIUM PSEUDOMONAS AERUGINOSA ALS PROTEASENQUELLE

Für unsere Untersuchungen zogen wir den bereits erwähnten, sehr aktiven Keim "*Pseudomonas aeruginosa*" heran, da er, aufgrund seiner medizinisch-biologischen Eigenschaften, günstige Untersuchungsvoraussetzungen bot.

Nach der Einteilung von BERGEY (Manual of Determinative Bacteriology 1948) gehört dieses Bakterium in die Ordnung I Pseudomonadales, in die Familie der Pseudomonadaceae (IV) zur Gattung *Pseudomonas* als bekanntester Vertreter. Es hat mehrere Namen. So wird es auch "*Pseudomonas pyocyanea*" oder "Bakterium *pyocyaneum*" oder trivial "*Pyocyaneus*" genannt.

Es wurde zum ersten Mal 1862 von LÜCKE entdeckt. (34) GESSARD gelang dann bereits 1882 die Züchtung des Bakteriums. (11) Als Erreger des blauen Eiters erkannten LEDDERHOSE und CHARRIN 1888/89 den *Pyocyaneus* (32). Seinen Farbstoff Pyocyanin konnte FORDOS schon 1860 in kristalliner Form gewinnen (6). Diese Farbstoffproduktion des Bakteriums wurde zu einem seiner wichtigsten Merkmale. Nach neueren Untersuchungen bildet der Keim neben dem chloroformlöslichen, blauen, in langen Nadeln kristallisierenden Pyocyanin noch zwei Farbstoffe. Das sind das wasserlösliche, grünliche Fluorescein und das wasserlösliche, chloroformunlösliche, rote Pyorubin. (33)

Das Bakterium *Pyocyaneum*, dessen Aufbau schon im allgemeinen Teil beschrieben wurde, ist ein Stäbchenbakterium ohne Endosporenbildung. In der praktischen Diagnostik wird der *Pyocyaneus* anhand der vegetativen Wuchsform des Einzelwesens zu der zylindrischen Wuchsgestalt gerechnet. Außerdem gehört er in die Gruppe der "Lophotricha" (vom Griechischen λόφος = Büschel). Das bedeutet, daß am Polende, seltener seiteständig, des Bakteriums ein Büschel von Geißeln hängt, das der Beweglichkeit des Bakteriums dient. Die Größe der Stäbchenbakterien und somit auch des *Pyocyaneus* bewegt sich zwischen 1,5 und 5 μ . In seltenen Fällen kann diese Größenordnung auch überschritten werden. Das spezifische Gewicht liegt zwischen 1,13 und 1,25. Alle Bakterien können unterschieden werden, auf Grund einer Färbemethode, die von GRAM angegeben wurde. Die Methode beruht auf der Affinität der Bakterien zu Anilinfarbstoffen. Sie ist ein Reagens auf Lipopolyglycerophosphatproteide. So können GRAM-positive, dieses Proteid enthaltende, und GRAM-negative Keime getrennt werden. Das Bakterium *Pyocyaneum* geht aus dieser Färbung als GRAM-negatives Bakterium hervor. Seine Vermehrung erfolgt durch Querteilung. Das heißt, die Stäbchen zeigen Querschnürungen, die zu einer Abtrennung führen und einzelne Stücke entstehen lassen. Eine Spaltung in der Längsrichtung wird selten beobachtet. Die für eine Vermehrung optimalen pH-Verhältnisse liegen in der Größenordnung von pH 6,2 bis pH 8,0. Verwendet man Bouillon als Nährlösung, wird ein Höchstmaß an

lebensfähigen Keimen bereits nach 18 Stunden Bebrütungszeit erreicht. Diese Zeit kann bis zu 48 Stunden ausgedehnt werden. Allerdings ist die Vermehrungsfähigkeit des Bakteriums begrenzt. Dies liegt in drei Tatsachen begründet. Erstens werden die Nahrungsbestandteile der Lösung aufgebraucht, zweitens wirken sich anfallende Stoffwechselprodukte hemmend auf das Wachstum aus und drittens treten langsam Veränderungen im pH-Wert ein, so daß ein ungünstiges Wachstumsmilieu entsteht. (13)

Das Bakterium *Pyocyaneum* hat einen aeroben Stoffwechsel. Das bedeutet, daß atmosphärischer Sauerstoff dem Bakterium als Wasserstoff-Akzeptor dient. Häufig kommt es durch diesen Vorgang zur Wasserstoffperoxydbildung. Nach GRUMBACH und KIKUTH drückt sich dieser Sauerstoffhunger des Keimes, wie auch eine Hydrophobie, in dem gelegentlich auftretenden Kulturmerkmal der "Kahmhaut"-Bildung aus. Biochemisch ist dieses Phänomen durch einen Cytochromkomplex charakterisiert, der aus drei eisenhaltigen Komponenten besteht, die in reduziertem Zustand typische Absorptionsspektren aufweisen. (12)

Das Wachstumsoptimum des Bakteriums wird in der Regel bei 37 Grad Celsius erreicht. Das entspricht der Körpertemperatur und es wird verständlich, daß die Keime bei ihrer dann "idealen Arbeitstemperatur" ihre Wirkung als Krankheitserreger voll entfalten können. Bei einer Temperaturerhöhung auf 50 Grad Celsius sterben die sporenfreien Bakterien ab. (13)

VERBREITUNG UND PATHOGENITÄT

Das Bakterium *Pyocyaneum* ist als Saprophyt ubiquitär verbreitet. Es gehört auch zur Normalflora des Intestinaltraktes. Seine beliebtesten Aufenthaltsorte sind Plätze mit feuchtem Milieu, so das Wasser, sanitäre Anlagen, der Boden, die Haut und nicht zuletzt die Mund- und Rachenschleimhaut.

Sein pathologisches Auftreten wird in der Literatur hinreichend beschrieben. Der *Pyocyaneus* verursachte, um einige Beispiele herauszugreifen, epidemische septische Nabelinfektionen bei Neugeborenen (52), Meningitiden, deren Letalität bis zu 86 % betrug (50), Darmentzündungen, die "Pyocyaneus-Ruhr" mit vielfach tödlichem Verlauf, eine hämorrhagische *Pyocyaneus* Sepsis und Hautgangränen (13). Ferner ist er zu finden als mischinfizierender Keim bei Eiterungen des Mittelohres, chronischen Sinusitiden und Mastoitiden und nicht zuletzt als gefährliche Komplikation bei Verbrennungen (4,5). Das Bakterium *Pyocyaneum* hat eine Spezifität für den menschlichen Wirtsorganismus, zählt also zu den menschenpathogenen Keimen. Seine Virulenz, worunter man den Grad seiner Angriffsfähigkeit versteht, ist sehr hoch und die Infektion mit diesem Keim führt zu einer der unangenehmsten und gefürchtetsten Infektionen. Die Komplikationen, die das Bakterium durch seine Anwesenheit verursachen kann, sind durch die heute bekannten Antibiotika

kaum zu beeinflussen. Neben Sulfonamiden, Tetracyclinen, Streptomycin und Chloramphenicol, die allesamt nur eine sehr begrenzte Wirkung zeigen, wird heute vor allem Gentamycin und Carbenicillin als deutlich überlegenes Antibiotikum in der Pyocyaneus-Therapie angewandt. Außer der Tatsache, daß bei dieser Antibiotika-Therapie durch neurotoxische Wirkung äußerst unangenehme Nebenerscheinungen, wie Innenohrschwerhörigkeit mit Taubheit zur Folge und anderes mehr, bekannt sind, liegen auch hier Untersuchungen über eine Inaktivierung von Komponenten des Gentamycin C auf enzymatischem Weg durch einen zellfreien Extrakt von *Pseudomonas aeruginosa* vor. (37)

Die Proteasenproduktion dieses Keimes stellt eine große Problematik im Hinblick auf die therapeutische Beherrschung einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion dar. Bei diesen extracellulären Proteasen handelt es sich nach Untersuchungen von MORIHARA um mindestens drei verschiedene Proteasen. Einer von ihnen werden Elastase-Eigenschaften zugeschrieben (26, 38 - 42). Daß es sich bei diesen Proteasen um hochwirksame Substanzen handeln muß, ist daraus ersichtlich, daß MUSZYNSKI in seinen neuesten Untersuchungen feststellt, daß zwischen der Proteasenproduktion von *Pseudomonas aeruginosa* und seiner Virulenz ein direkter Zusammenhang besteht (44). Diese Feststellungen werden auch bestätigt durch weitere Arbeiten von MEINKE und BARK (35). Auch sie führen die Pathogenität des Bakteriums auf seine hohe Produktion sehr ak-

tiver Proteasen zurück. - Diese Überlegungen waren der Anlaß, die Hemmbarkeit der extracellulären Proteasen von *Pseudomonas aeruginosa* zu untersuchen.

INHIBITOREN

Bei der Auswahl, welche Proteinaseinhibitoren für die Versuche Verwendung finden konnten, waren zwei Überlegungen ausschlaggebend.

Zum einen erschien es von Interesse, festzustellen, ob der vom Bakterium befallene Organismus nicht die Möglichkeit hätte, durch körpereigenes Inhibitormaterial dem Angriff bakterieller Proteasen entgegenzuwirken. Eine ähnliche Vermutung besteht auch bei der physiologischen Bedeutung pflanzlicher Inhibitoren (51). Auch sie werden im Zusammenhang mit einer Schutzfunktion gegenüber Proteasen von symbiontischen Bakterien gesehen. Inwieweit die pflanzlichen Inhibitoren auch im menschlichen Organismus gegen bakterielle Proteasen eingesetzt werden können, war ebenfalls zu überprüfen.

Die zweite Überlegung ging davon aus, daß in den oberen Luftwegen und den Nasennebenhöhlen eine Sekretion von Proteinaseinhibitoren mit einem definierten Hemmspektrum stattfindet (22, 24, 47). Diese Inhibitoren schützen die Gewebe in bestimmten Grenzen vor

allem vor der Wirkung von Proteasen, die aus zerfallenden Leukozyten freigesetzt werden und möglicherweise auch vor Bakterienproteinasen. Nun ergab sich aber daraus ein Widerspruch zu den Beobachtungen, die mit Pyocyaneus-Proteinasen gemacht werden konnten. Auf sie entfalten nämlich die eben erwähnten Inhibitoren nur eine geringe Wirkung.

Um diese Zusammenhänge zu untersuchen, war es notwendig, zunächst die Reihe der "Natürlichen Proteinaseinhibitoren" zu prüfen.

Unter die natürlichen Proteinaseinhibitoren werden einmal die pflanzlichen Inhibitoren gerechnet und zum anderen die Inhibitoren des tierischen und des menschlichen Organismus. Diese Stoffe sind Polypeptide, die einmal niederes Molekulargewicht (6000 - 12000) besitzen und säure- und thermostabil sind und deren anderer Teil ein hohes Molekulargewicht (20000 - 820000) zeigt. Betrachtet man die Hemmspektren der Inhibitoren, so können polyvalente, mehrere Enzyme hemmende und monovalente Inhibitoren unterschieden werden (51).

C E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

MATERIALIEN

A Die Proteasen

1. Herkunft der Proteasen

Wie bereits beschrieben, wurde als Proteasenquelle das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* herangezogen. Zur Verwendung kam ein nicht näher bestimmter Stamm dieses Keimes, der vom Routinelabor des Max-von-Pettenkofer-Institutes für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Universität München für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde.

2. Gewinnung

Als Nährmedium für die Züchtung des Keimes wurde eine einfache Peptonbouillon verwendet. Statt Fleischwasser und 1 % Pepton wurde eine 2,5%-ige Lösung von Pepton e carne trypt. der Fa. "Merck" hergestellt. Rindfleisch enthält etwa 0,1 % Dextrose; diese Zuckerspitze war in Pepton e carne noch enthalten. Die Lösung wurde mit 5g NaCl aufgekocht und mit 10%-iger NaOH ein pH von 7,4 eingestellt. Die filtrierte, in

Kolben abgefüllte und autoklavierte Bouillon zeigte das End-pH 7,2 , entstanden durch leichte Säuerung während des Autoklavierens.

Diese Peptonbouillon wurde in einen Glaskolben mit mehreren Lamellen an der Innenwandung gebracht. Sodann erfolgte die Inokulation des Keimes und die Befestigung des Kolbens auf einer Schüttelmaschine. So wurde durch vielfache Wirbelbildung der Nährflüssigkeit eine gute Durchmischung der Bouillon mit Luft-sauerstoff möglich - unerlässlich für ein kräftiges Wachstum des aeroben Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*. Die Dauer der Inkubation dieser Schüttelkultur wurde auf 18 Stunden festgesetzt und über diesen Zeitraum eine Temperatur von 37 Grad Celsius aufrechterhalten. Zur Entfernung der Bakterien-Zellen aus der Kulturflüssigkeit folgte eine Zentrifugation 20 Minuten bei 10.000 UpM. Diese hohen Umdrehungszahlen und langen Zentrifugationszeiten waren nötig, um die Zellen, bei fast gleicher Dichte wie das Nährmedium auszuschleudern. Während des Zentrifugierens entstandene Reibungswärme wurde abgeführt, um eine Enzymschädigung auszuschließen. Die optische Dichte des Kulturüberstandes betrug 2,5. Eine Dialyse der Flüssigkeit wurde angeschlossen. In 72 Stunden führte diese zu einer Entfernung der Pepton-Moleküle der Nährlösung aus dem Kulturüberstand. Um eine Überalterung der Enzyme zu verhindern, mußte ein Lyophilisationsvorgang vorgenommen werden.

Das Lyophilisat wurde als Proteasenquelle verwendet.

B Die Inhibitoren

Wie oben ausgeführt und begründet wurde, sollten die natürlichen Proteinaseinhibitoren bei der Auswahl des Inhibitormaterials herangezogen werden. Da das menschliche Blut Plasmaproteine besitzt, die zu 10 % die Fähigkeit haben, proteolytisch wirkende Enzyme zu binden oder zu neutralisieren und da es eine Reihe von sechs solchen Proteinaseinhibitoren besitzt, die in einer Konzentration von 701,2 mg/100ml Serum enthalten sind, schien das Humanserum zunächst das wichtigste Inhibitormaterial (15).

Weiterhin sollten die im Serum enthaltenen wichtigsten Inhibitoren für sich allein getestet werden: α_1 -Antitrypsin, Inter- α -Trypsin-Inhibitor, α_1 -Antichymotrypsin, α_2 -Makroglobulin. Ebenso der Inhibitor aus menschlichem Bronchialsekret, Seren von Rind und Schwein, der polyvalente Proteaseninhibitor aus Rinderorganen, des weiteren der Inhibitor aus der Glandula submandibularis vom Hund und zuletzt, als Vertreter der natürlichen pflanzlichen Inhibitoren, der Inhibitor aus Keimen von Roggen. Mit dieser Auswahl konnte ein breites Spektrum erreicht werden.

I. Seren

Die im Versuch verwendeten Seren entnahmen wir von Personal und Patienten der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universität München. Die Patienten entstammten allen Altersgruppen und wurden anamnestisch nach folgenden Kriterien ausgewählt:

1. Gesunde Spender mit Normalserum:

- a, Sch. M. weiblich
- b, He. o. männlich
- c, Ba. K. "

2. Patienten mit leichten entzündlichen Erkrankungen:

- a, Po. H. männlich
- b, Kl. M. "

3. Patienten mit schwerwiegenden Erkrankungen:

- a, Pe. R. männlich Ca-Patient
- b, Re. H. " Nasen Ca-Patient
- c, Sch. G. " Nasenbluter

4. Patienten mit schwerer Pyocyaneus-Infektion:

- a, Mü. A. weiblich Serum vom 27. 3. 73
- " " 29. 3. 73
- " " 2. 4. 73
- b, Os. W. männlich
- c, Si. A. "

(Bei zweien der Pyocyaneus-Patienten führte die Erkrankung kurze Zeit später zum Tod.)

Das Frischblut dieser Patienten wurde kurz nach der Entnahme bei 4.000 UpM zehn Minuten zentrifugiert; das so erhaltene Serum sofort zur Testung herangezogen.

II. α_1 -Antitrypsin (α_1 - AT)

Dieser polyvalente Inhibitor stammt aus der α_1 -Globulin-Fraktion. Er ist ein Hemmstoff für Trypsin und Chymotrypsin, daneben noch für Plasmin, Pankreas-Kallikrein und Elastase. Außerdem hemmt er Leukozytenproteasen. Die Proteinase-Hemmkapazität des Humanserums hängt neben α_2 -Makroglobulin zum größten Teil von α_1 -AT ab. Es ist der vorherrschende Inhibitor mit 90 % der Trypsin-hemmenden-Kapazität des Serums. $1\mu\text{g}$ reinstes Präparat α_1 - AT hemmt 0,4 - 0,6 μg Trypsin bzw. 0,25 μg Chymotrypsin zu 100 %. 1 ml Serum hemmt etwa 0,4 - 2,0 mg Trypsin. Das pH-Optimum für α_1 - AT liegt im neutralen pH-Bereich. (Weitere Werte siehe Tabelle 1) (48, 51)

Das von uns verwendete Präparat wurde von den Behring-Werken bezogen.

III. α_1 -Antichymotrypsin (α_1 - X)

Der spezifische Chymotrypsin-Inhibitor kommt aus dem Post-Albumin-Bereich des Humanserums.

Vom Reinpräparat ist 1 mg α_1 - X in der Lage 0,3 mg Chymotrypsin zu hemmen. Das pH-Optimum für α_1 - X

liegt im neutralen pH-Bereich. (Weitere Werte siehe Tabelle 1) (51)

Das von uns verwendete Präparat wurde von den Behring-Werken bezogen.

IV. Inter- α -Trypsin-Inhibitor (I - α - I)

Der Name dieses hochmolekularen Inhibitors gibt seine Herkunft an. Er ist zwischen der α_4 und α_2 -Globulinfraktion zu finden. Er ist ein spezifischer Inhibitor für Trypsin. 1 mg des reinen Inhibitor-Präparates hemmt zwischen 0,15 - 0,2 mg Trypsin. (Weitere Werte siehe Tabelle 1) (51)

Das von uns verwendete Präparat wurde von den Behring-Werken bezogen.

V. α_2 -Makroglobulin (α_2 - M)

Auf den polyvalenten Inhibitor α_2 - M entfallen nahezu die restlichen 10 % der Trypsin-inhibitorischen Kapazität des Serums. Er findet sich in der α_2 -Globulinfraktion des Humanserums. Zu hemmen vermag er Trypsin, Chymotrypsin, bevorzugt und augenblicklich Plasmin, des weiteren Plasma-Kallikrein, Thrombin und Elastase. Der α_2 - M Inhibitor hat eine stärkere Affinität zu Proteasen als α_4 - AT und ist auch bei einer Temperatur von 0 Grad Celsius noch in der Lage, Proteasen zu binden. Obwohl aus der Globulinfraktion stammend, ist der Inhibitor relativ hitze-

stabil und in Trichloressigsäure löslich, was seine Abgrenzung vom α_1 -Inhibitor ermöglichte. Er hat sehr hohes Molekulargewicht von 820.000. 1 mg des α_2 - M kann 17 - 40 μ g Trypsin hemmen. Günstig sind dabei hohe Pufferkonzentrationen. (Weitere Werte siehe Tabelle 1) (15, 51)

Das von uns verwendete Präparat wurde von den Behring-Werken bezogen.

VI. Bronchialsekret-Inhibitor

Nach Auffinden eines niedermolekularen Proteaseninhibitors im menschlichen Nasensekret führten Untersuchungen von Bronchialsekret laryngektomierter und intubierter Patienten zur Isolierung eines ebenfalls niedermolekularen Bronchialsekretinhibitors (19, 47). Die inhibitorische Gesamtaktivität des menschlichen Bronchialsekretes beruht zu 70 % auf dieser niedermolekularen Inhibitorfraktion. Weitere Untersuchungen ergaben eine Aufteilung dieser Fraktion in zwei verschiedene niedermolekulare Inhibitoren, deren Molekulargewichte etwa 13.000 und 20.000 betragen. Die Hemmaktivitäten liegen im Verhältnis 15 % zu 85 % vor. Die Inhibitoren sind säurestabil und nicht fällbar. Sie hemmen Trypsin, Chymotrypsin, leukozytäre Proteasen und die bakterielle Protease Pronase (24, 48). Der von uns verwendete Inhibitor wurde wie in l. c. (21) dargestellt.

VII. Inhibitor aus der Glandula submandibularis vom Hund

Der aus den Submandibularis-Drüsen von Hunden gewonnene Inhibitor ist hitze- und säure-stabil und nicht fällbar. Sein Molekulargewicht liegt bei 13.000. Der Inhibitor hemmt Trypsin (Rind), α_1 -Chymotrypsin, Subtilisin NOVO, Pankreas-Elastase (Schwein), Plasmin (Schwein), teilweise Pronase (ein Gemisch von Bakterienproteasen) und Proteasen von "Aspergillus oryzae".

Der von uns verwendete Inhibitor wurde wie in l.c. (9) dargestellt.

VIII. Inhibitor aus Keimen von Roggen

Dieser Inhibitor wurde aus Keimen von Roggen- und Weizen-Samen gewonnen. Er konnte in einen einheitlichen Inhibitor mit dem Molekulargewicht 1700 und drei weitere Inhibitoren mit dem Molekulargewicht 1200 aufgespalten werden. Diese Inhibitoren sind spezifische Trypsin-Inhibitoren mit permanenter Wirkung.

Der von uns verwendete Inhibitor wurde wie in l.c. (17) dargestellt.

IX. Polyvalenter Rinderorgan-Inhibitor

Der von uns verwendete Inhibitor war das Präparat "TRASYLOL" der Fa. Bayer. Es wird im wesentlichen aus Glandula parotis und Lunge von Rindern gewonnen. Sein

Molekulargewicht beträgt 6.700 ± 200 . Der Inhibitor ist hitze- und säure-stabil. Er vermag Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin und einige Bakterienproteinasen zu hemmen, weiterhin Elastase und Thrombin. (51)

X. Serum vom Rind

XI. Serum vom Schwein

Die als Inhibitorenquelle verwendeten Seren vom Rind und Schwein wurden als Frischseren vom Schlacht- und Viehhof der Stadt München erhalten.

Alle verwendeten Inhibitoren wurden in den Ansätzen durch 0,2 M Triäthanolamin-HCl Puffer, pH 7,8 , verdünnt.

Tabelle 1

Zusammenstellung der Daten derjenigen Serum-Inhibitoren, die im Test verwendet wurden

Inhibitor	Serum-Fraktion	Serum-Konzentrat. mg/ 100ml	Mol.-Gewicht	S.-Konz. in μ Mol	Peptid-Gehalt	Carbohydrat-Gehalt
1. α_1 -Antitrypsin (α_1 - AT)	α_1 -Globulin Fraktion	290 $\pm$ 45	54 000	54,0	86 %	davon: 12,4% 4,7%Hexosen 3,9%Hexosamin 3,6%Acetylneur- aminsäure 0,2%Fucose
2. α_1 -Antichymotrypsin (α_1 - X)	Postalbumin Bereich	48,7 $\pm$ 6,5	69 000	7,0	73 %	24,6% 3,4%Hexose 3,5%Acetylhexos- amin
3. Inter- α -Trypsin Inhibitor (I- α -I)	zwischen α_1 - α_2 Globul. Fraktion	50	160 000	3,1	90 %	2,1%Sialinsäure 0,1%Fucose
4. α_2 -Makroglobulin (α_2 - M)	α_2 -Globulin Fraktion	260 $\pm$ 70	820 000	3,3	92 %	7,7%

Ergänzte Tabelle nach Norbert Heimburger in Pulmonary Emphysema and Proteolysis
(Hrsg. Mittman Ch.) Academic Press New York/London 1972

Tabelle 2

Spezifität der im Test verwendeten Inhibitoren

- 36 -

Inhibitor	Trypsin	Chymo- trypsin	Plasmin	Plasma- Kallikr.	Pankreas- Kallikr.	Thrombin	C'l- Esterase	Elastase	Sonstiges
α_1 -AT	+	+	+	?	+	-	-	+	{Leukoz. Pro.
α_1 -X	-	+	-	?	-	-	-	-	
I- α -I	+	schwach	-	?	-	-	-	-	
α_2 -M	+	+	+	+	-	+	-	+	{Bakterien Proteinasen
TRASYLOL	+	+	+	+	+	schwach	-	+	{Leukoz.
BRONCHIAL SEKRET-I.	+	+	-	-	-	-	-	-	{Prot.+Pronase {Subtilisin-Novo
SUBMANDIB: INH.HUND	+	+(α)	+	-	-	-	-	+	{Pronase {Asperg.oryzae Prot.
ROGGEN- INH.	+	-	-	-	-	-	-	(Schweine Pankreas)	

Erweiterte Tabelle nach N. Heimburger in Pulmonary Emphysema and Proteolysis

(Hrsg. Mittman Ch.) Academic Press New York/London 1972

METHODEN

Bei unseren Untersuchungen haben wir im wesentlichen drei Testmethoden angewandt.

I. Bestimmung der Hemmkapazität

Um den Inhibitorgehalt einer Lösung mit Proteinaseinhibitor genau feststellen zu können, ist es erforderlich, eine vom Inhibitor hemmbare, definierte Proteasemenge ein geeignetes Substrat verdauen zu lassen. Die bei der Spaltung entstandenen Substratbruchstücke können photometrisch durch Extinktionsänderung nachgewiesen werden. Es besteht ein lineares Verhältnis zwischen der Zeiteinheit der Messung und der Quantität der entstandenen Spaltprodukte. Bei der Zugabe von Inhibitorlösung konnte eine Abnahme der Extinktionsänderung in der Zeiteinheit gemessen werden. Diese Verminderung der Extinktionsdifferenz gegenüber dem Leerwert (Spaltansatz ohne Inhibitor) ist ein Maß für den Inhibitorgehalt der Lösung.

Nach bekannter Methode wird die Protease Trypsin gegen das synthetische Substrat $N\alpha$ -Benzoyl-arginin-p-nitro-anilid (BAPA) zur Spaltung eingesetzt (8). Dabei zeigt sich bei ungehemmter Reaktion pro $1\ \mu\text{g}$ Trypsin eine Extinktionszunahme von 0,0033 Teilstrichen pro Minute.

Die Hemmkapazität der Inhibitorlösung geben wir in ImU (= Inhibitormilliunits) pro ml Inhibitor-Lösung, bzw. pro mg Inhibitor-Protein an.

Eine ImU ist diejenige Inhibitormenge, die die hydrolytische Wirkung von $1 \mu\text{g}$ Trypsin gegen BAPA aufhebt. Das bedeutet am Photometer eine Verminderung der Extinktionszunahme von 0,0033 Teilstrichen pro Minute.

Ansätze:

In Küvetten, mit $d = 1 \text{ cm}$, eines thermostatisierbaren Photometers, mit der eingestellten Temperatur von 25 Grad Celsius, werden $10 \mu\text{g}$ Trypsin eingebracht, das in 0,2 ml 0,0025 n HCl gelöst ist. In der Küvette mit dem ungehemmten Spaltwert wird mit 0,2 M Triäthanolamin-HCl Puffer (TRAP), pH 7,8, zum Endvolumen 2 ml aufgefüllt. In die weiteren Küvetten werden 0,05 - 0,2 ml, das ist abhängig vom Hemmstoffgehalt, Inhibitor-haltige Lösungen eingebracht und jeweils mit demselben TRA-Puffer auf 2 ml Endvolumen aufgefüllt. Nach 5 Minuten Vorinkubation wird je ein ml BAPA-Substrat, gelöst in Wasser, zugegeben und der Inhalt jeder Küvette gut durchgemischt.

(Endkonzentration = $0,73 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

Beim Filter 405 nm muß nun die Extinktionszunahme pro Minute gemessen und der Inhibitorgehalt nach folgender Beziehung berechnet werden:

$$\frac{\frac{\Delta LW}{\text{min}} - \frac{\Delta E_H}{\text{min}}}{0,0033} \cdot X = \text{Anzahl der ImU mg Inhibitorprotein}$$

Zeichenerklärung:

ΔE_H = Ext.Änder. der Lösung mit Inhib.

ΔLW = Reiner Spaltwert - Ext. Änder.

X = Verdünnungsfaktoren der Inhib. Lsg.

Diese Methode diente zur Bestimmung äquivalenter Inhibitormengen für die jeweiligen Ansätze gegen die Proteasen aus *Pseudomonas aeruginosa*.

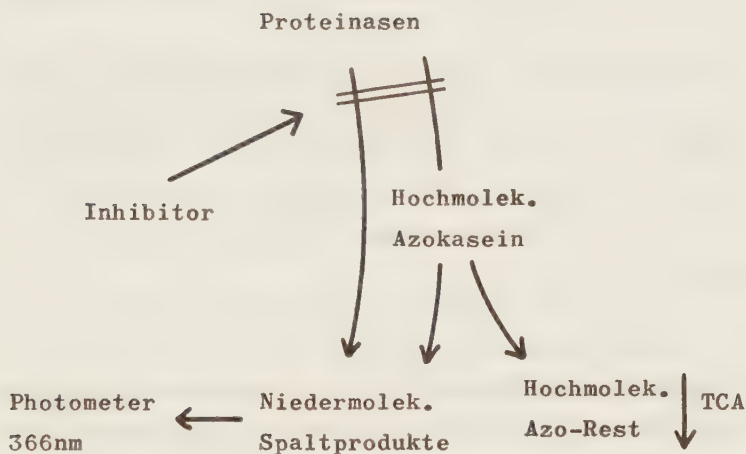
II. Proteasenaktivitätstest mit Azokasein

Um die hydrolytische Wirkung der Kulturflüssigkeit von *Pseudomonas aeruginosa* untersuchen zu können, wird ein Substrat benötigt, das von den bakteriellen Proteasen leicht gespalten werden kann. Die beiden

synthetischen Proteasensubstrate $N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid und Succinyl-L-phenyl-alanin-4-nitroanilid werden nicht gespalten. Jedoch das unspezifische Proteasensubstrat Azokasein wird von der Kulturflüssigkeit des *Pyocyanus* verhältnismäßig rasch hydrolysiert. Es ist möglich, mit Azokasein die gesamte proteolytische Aktivität der Kulturflüssigkeit zu erfassen, einschließlich der bereits erwähnten Elastase-Aktivität.

Der Versuchsablauf, wie ihn auch das Schema darstellt, ist folgender:

Die Moleküle einer Azokaseinlösung werden durch die Einwirkung von Proteinasen in niedermolekulare Teilprodukte gespalten. Gibt man nun hochmolekulares Substrat im Überschuß und fällt nach einer bestimmten Zeit der Spaltung den hochmolekularen Rest aus, so kann der entstandene niedermolekulare Anteil photometrisch gemessen werden. Die zu beobachtende Extinktionssteigerung gegenüber einem sofort gefällten, gleichartigen Ansatz ist ein Maß für die Aktivität der proteolytischen Enzyme. Ist ein Inhibitor anwesend, der die Wirkung der Proteinasen abblockt, sinkt die Quantität der niedermolekularen Spaltprodukte und es resultiert eine verminderte Extinktion. Die Extinktionsabnahme ist ein Maß für die Hemmwirkung des zugegebenen Inhibitormaterials. (7)



Ansätze:

In einer Reihe von Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß Ansätze mit folgenden eingesetzten Mengen die besten Ergebnisse boten:

Es werden 200 μ g lyophilisierten Kulturüberstandes gelöst in 0,2 ml 0,2 M Triäthanol-HCl Puffer (TRAP), pH 7,8. Mit 0,8 ml Puffer der gleichen Zusammensetzung wird auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Diesen Ansatz inkubieren wir mit 2 ml einer 2%igen Azokaseinlösung in gleichem Puffer für 30 Minuten bei einer Temperatur von 37 Grad Celsius.

Danach wird durch Zugabe von 3 ml einer 5%igen Trichloressigsäure (TCA) die Reaktion abgebrochen

und nicht verdautes, hochmolekulares Substrat ausgefällt.

Anschließend erfolgt eine 5 Minuten dauernde Zentrifugation bei 4.000 UpM. Der Überstand wird filtriert und die so gewonnene klare Flüssigkeit am Photometer gegen einen nicht inkubierten, sofort gefällten Spaltansatz gleicher Zusammensetzung bei 366nm gemessen.

Das von uns verwendete Lyophilisat von *Pseudomonas aeruginosa* erbrachte unter den beschriebenen Bedingungen eine Extinktion von 0,406 - 0,425 bei $d=1$ cm. Diese Extinktion bezeichneten wir als relative Enzymaktivität von 100 %. Sie diente als Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen, insbesondere für die Beurteilung der Hemmfähigkeit der einzelnen Inhibitoren.

III. Proteasenaktivitätstest bei verschiedenen pH-Werten

Um optimale Milieu-Verhältnisse für unsere Versuche sicherzustellen, schien es notwendig, die Quantität der Substratspaltung bei verschiedenen pH-Werten zu untersuchen. Wir wählten vom extrem sauren pH-Wert 4,0 bis zum stark basischen pH-Wert 9,5 in Abständen von pH 0,5 jeden Wert für den Aktivitätstest. So wurde eine relativ genaue Angabe der besten pH-Verhältnisse möglich.

Als Puffer fand für den Bereich von pH 4,0 - 6,5 ein 0,2 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) Puffer Verwendung. Für den pH-Bereich von 7,0 - 9,5 wurde ein 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) Puffer herangezogen. Die Einstellung der jeweiligen pH-Werte erfolgte mit konz. HCl bzw. mit konz. NaOH.

IV. Bestimmung der Hemmkapazität der Inhibitoren

Um die Hemmwirkung der verschiedenen Inhibitoren gegen die Proteinasen aus *Pseudomonas aeruginosa* zu untersuchen, wurden zu dem beschriebenen Standardansatz steigende Mengen Inhibitor zugesetzt. Die Konzentrationen der verschiedenen Inhibitorlösungen wurden nach ihrem, im Antitrypsintest mit BAPA unter Standardbedingungen ermittelten Gehalt an ImU bestimmt. So konnten aliquote Teile mit gleicher Inhibitoraktivität gegen Trypsin bei den Hemmversuchen eingesetzt werden.

Ansätze:

Es werden 200 μg Lyophilisat der Kulturflüssigkeit gelöst in 0,2 ml 0,2 M TRAP, pH 7,8, mit Inhibitorlösungen in Puffer gleicher Zusammensetzung und Puffer allein auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht. Es folgt die Zugabe von 2 ml 2%iger Azokaseinlösung in gleichem Puffer und Inkubation 30 Minuten bei 37 Grad Celsius, Fällung mit 3 ml 5%iger TCA, Zentri-

fugation, Filtration und photometrische Auswertung bei 366nm.

Für alle verwendeten Seren, vom Menschen, Rind und Schwein ergab sich die Notwendigkeit einer Verdünnung im Verhältnis Serum : Puffer wie 1 : 10.

Die verwendeten Mengen Serumverdünnung stiegen von 0,05 - 0,5 ml an.

Weiterhin wurden die einzelnen Seruminhhibitoren in einer, der Standard-Serumkonzentration entsprechenden, Verdünnung in derselben Menge wie die Seren selbst im Test untersucht.

V. Bestimmung der α_2 -Makroglobulin-Konzentration der Testseren

Die Untersuchungsergebnisse ließen eine Überprüfung der α_2 - M - Gehalte der verwendeten Testseren notwendig werden.

Diese quantitative Plasmaproteinbestimmung konnte mit M-Partigen Immundiffusionsplatten der Behringwerke durchgeführt werden. Die M-Partigenplatten für α_2 - M enthalten ein monospezifisches Antiserum gegen das Plasmaprotein α_2 - M.

Die Trägersubstanz ist eine Agar-Gelschicht.

Die Platten werden mit Protein-Standardverdünnungen (1 : 4, 1 : 2, unverd.) und mit 1 : 2 verdünnten

Serumproben beschickt, die Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. Nach einer Aufbewahrungszeit von 72 Stunden bei Raumtemperatur werden die entstandenen Präzipitatringe im Gel der Platten auf 0,1 mm genau ausgemessen.

Die quadrierten Ringdurchmesser der Standardlösungen ergeben eine Eichkurve, an der der α_2 -M - Gehalt der Serumproben direkt abgelesen werden kann.

D E R G E B N I S S E

Wie schon im Kapitel "Methoden" erläutert wurde, verwendeten wir bei unseren Proteinase-Hemmtests einen 0,2 M Triäthanolamin-HCl Puffer, pH 7,8. Die Überprüfung darunter und darüber liegender pH-Werte von 4,0 - 9,5 hat ergeben, daß die weitaus größte Aktivität der untersuchten bakteriellen Proteinase im Bereich zwischen pH 7,5 und 8,0 liegt. Aus diesem Grund wurden alle Messungen bei dem pH von 7,8 durchgeführt.

Im menschlichen Bronchialsekret konnte die proteasen-inhibitorische Wirkung auf zwei Inhibitoren zurückgeführt werden (21, 48). Sie geht zu 20 % auf den, aus dem Plasma sezernierten Inhibitor α_1 -Antitrypsin und zu 80 % auf einen säurestabilen, niedermolekularen Inhibitor zurück, der mit dem Inter- α -Trypsin-Inhibitor eine Antigenverwandtschaft zeigt (23). Im Test wurden diese beiden Inhibitoren auf ihre Hemmwirkung gegen die Proteinase aus *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Es zeigte sich, daß mit α_1 -AT keinerlei Wirkung auf die Proteinaseaktivität ausgeübt werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte nach Zugabe des niedermolekularen, säurestabilen Bronchialsekretinhibitor nur noch eine Restaktivität der Proteinase von 75 % festgestellt werden. Das entspricht einer Hemmwirkung dieses Inhibitors gegenüber den

bakteriellen Proteasen aus *Pseudomonas aeruginosa* von 25 %, was auch den erreichbaren Endhemmgrad bedeutet.

Die Überprüfung der weiteren, bisher hauptsächlich charakterisierten, polyvalenten, natürlichen Proteinaseinhibitoren, deren Molekulargewichte im Bereich zwischen 6.000 und 12.000 liegen, brachte ein einheitliches Ergebnis. Weder durch den Inhibitor aus der Glandula submandibularis des Hundes noch durch den Inhibitor aus Roggenkeimen, noch durch den polyvalenten Inhibitor aus Rinderorganen, TRASYLOL, war, selbst bei hohen Einsätzen, eine Hemmwirkung zu erzielen. Des weiteren verhielten sich auch die neben α_1 -AT noch im menschlichen Serum enthaltenen Inhibitoren α_1 -Antichymotrypsin und der Inter- α -Trypsin-Inhibitor negativ. Sie hatten keinerlei Einfluß auf die hydrolytische Wirkung der *Pyocyaneus* Proteasen gegenüber Azokasein.

Völlig andere Ergebnisse brachten dagegen die Versuche mit Seren vom Menschen. Es zeigte sich eine praktisch vollständige Hemmbarkeit der bakteriellen Proteasen durch die eingesetzten Serummengen. Als Restaktivität blieben nur etwa 8 - 9 % der ursprünglichen Aktivität übrig. Die Hemmung erfolgte rasch und schon mit relativ geringen Serumeinsätzen. So konnte die Menge von 200 μ g Lyophilisat bereits mit 0,02 ml Standard-Serum zu 90 % gehemmt werden.

Die Hemmung erfolgte unabhängig von dem im Anti-trypsintest ermittelten Inhibitorgehalt des Serums. Obwohl die Zahl der berechneten ImU / ml von Seren dreier verschiedener, jeweils aus den Spendergruppen eins, zwei und drei stammender Personen völlig unterschiedliche Ergebnisse brachten, ist die meßbare Hemmkapazität aller Seren praktisch gleich. Wie aus Abbildung 1 zu ersehen ist, haben die Kurven 1, 2 und 3 nahezu die gleiche Steigung und erreichen denselben Endhemmgrad.

Die gleiche Hemmwirkung, wie sie mit menschlichem Serum erreichbar war, ließ sich auch mit Serum vom Rind und vom Schwein nachweisen. Auch diese Seren erbrachten Endhemmwerte von über 90 %.

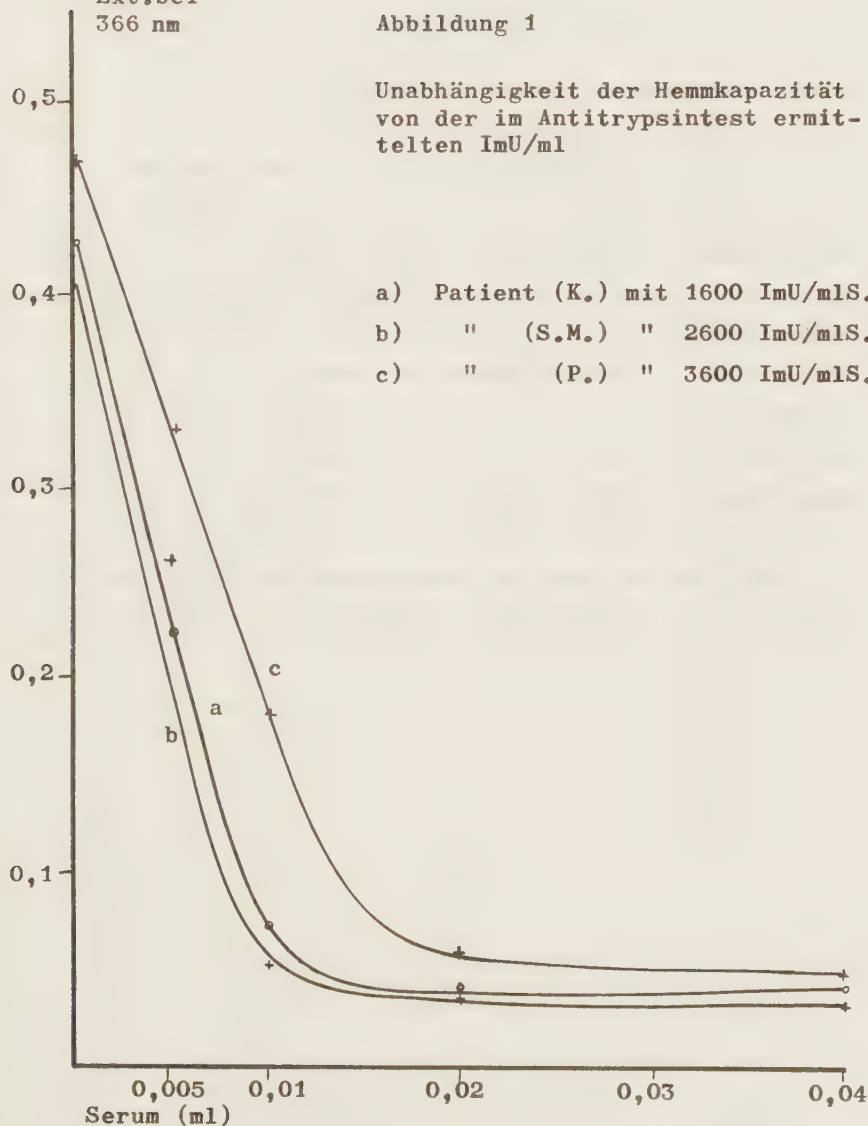
Nachdem die Wirkungslosigkeit der oben angegebenen Seruminhibitoren α_1 -AT, α_1 -X, Inter- α -Trypsin-Inhibitor nachgewiesen war und sich auch kein direkter Zusammenhang zwischen der Hemmwirkung der Seren und der im Antitrypsintest ermittelten Inhibitorkapazität der Seren herstellen ließ, konnten wir vermuten, daß die Hemmwirkung der Seren von dem polyvalenten Seruminhibitor α_2 -Makroglobulin ausgehen mußte. Die Testergebnisse bestätigten diese Vermutung. Das α_2 -Makroglobulin stellt einen Inhibitor mit sehr breitem Hemmspektrum dar. (1, 10, 25, 28, 29, 45, 53, 54) Die Hemmfähigkeit verschiedener Seren variierte, wobei die Hemmwirkung vom α_2 -Makroglobulin-Gehalt des verwendeten Serums abhängig war. Die für

Ext. bei
366 nm

Abbildung 1

Unabhängigkeit der Hemmkapazität
von der im Antitrypsintest ermit-
telten ImU/ml

- a) Patient (K.) mit 1600 ImU/mlS.
- b) " (S.M.) " 2600 ImU/mlS.
- c) " (P.) " 3600 ImU/mlS.



eine vollständige Hemmung von 200 μg Lyophilisat notwendige Menge Inhibitor betrug 35 - 40 μg α_2 -M.

Diese Zusammenhänge verdeutlichte auch ein Vergleich jeweils gleicher eingesetzter Mengen verschiedener Seren mit unterschiedlicher α_2 -M-Konzentration. Wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist, sank die prozentuale Restaktivität der Proteasen, obwohl gleiche Mengen Serum zugegeben wurden. Dies war auf den steigenden Inhibitorgehalt der Seren (von 114 mg/100ml - 224 mg/100ml) zurückzuführen. Der schraffierte Teil der Tabelle gibt den Bereich an, in dem bereits der Endhemmgrad erreicht ist, also lediglich die 8 - 9%ige Restaktivität verblieb. Die Abbildung 2 gibt die zu Tabelle 3 gehörigen Hemmkurven wieder. Auch bei ihnen ist die deutlich zunehmende Steilheit, proportional der steigenden α_2 -Makroglobulin-Konzentration im Serum, erkennbar.

Tabelle 3

Abhängigkeit der Hemmung vom α_2 - M Gehalt des Serums

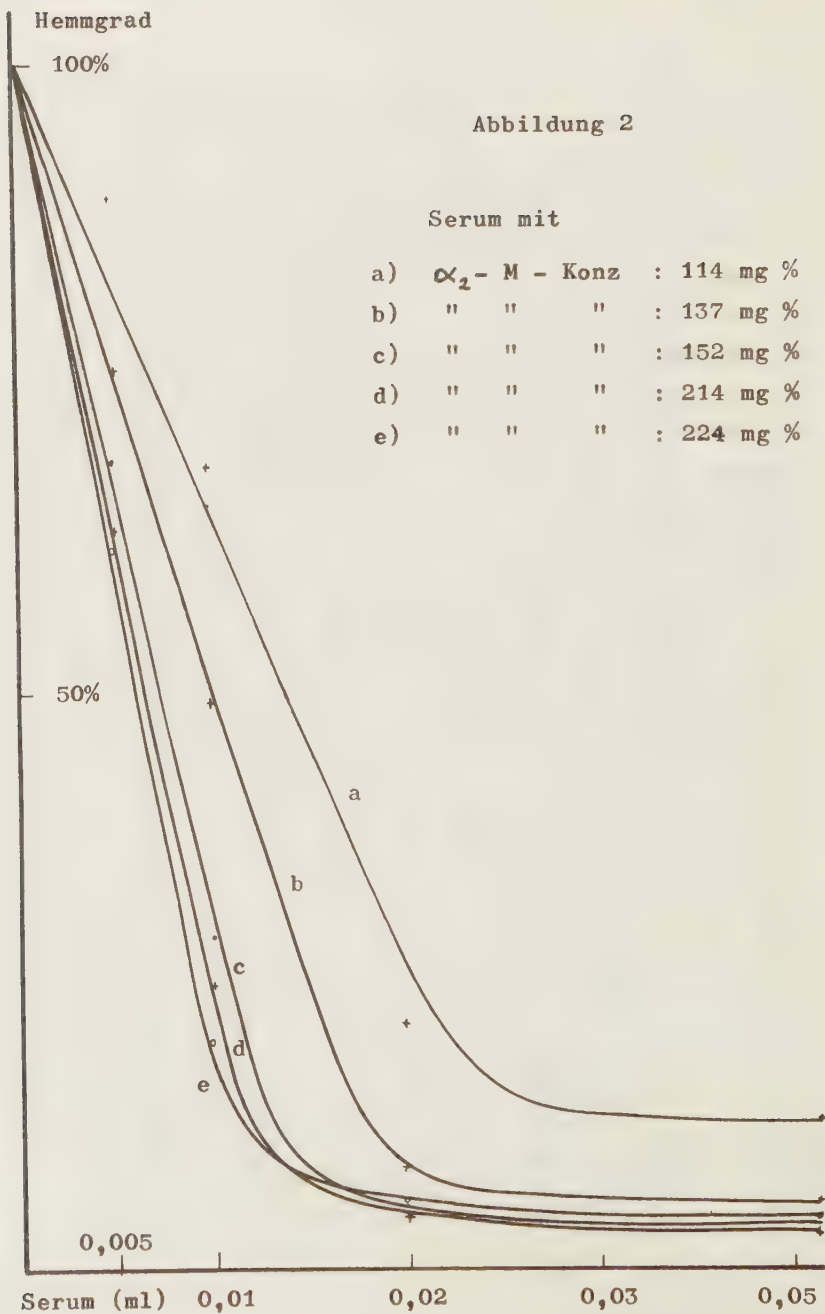
Serum α_2 - M Konzentration	Eingesetzte Serummengen in ml			
	0,005	0,01	0,02	0,05
114 mg/100ml	89,5	68,2	24,2	10,7
137 "	75,6	49,7	12,8	9,5
152 "	68,5	31,0	10,1	9,8
214 "	63,5	27,8	9,4	8,9
224 "	62,5	23,2	10,5	10,1

Die Zahlen geben die jeweilige Restaktivität in Prozent nach Hemmung durch
Humanserum an.

Abbildung 2

Serum mit

- | | | | |
|----|-----------------------|---|----------|
| a) | α_2 - M - Konz | : | 114 mg % |
| b) | " " " | : | 137 mg % |
| c) | " " " | : | 152 mg % |
| d) | " " " | : | 214 mg % |
| e) | " " " | : | 224 mg % |



Die Proportionalität zwischen Hemmung und α_2 -M-Konz. eines Serums wird auch noch durch folgende Überlegung bestätigt:

Werden zwei verschiedene Seren mit unterschiedlichen α_2 - M - Konzentrationen (202 bzw. 114 mg/100 ml) nicht in Abhängigkeit der Hemmfähigkeit gleicher Volumina untersucht, sondern in Abhängigkeit von dem, im angesetzten Serum tatsächlich vorhandenen α_2 - M, so ergeben sich zwei identische Hemmkurven. Diese Beziehung wird durch Abbildung 3 verdeutlicht.

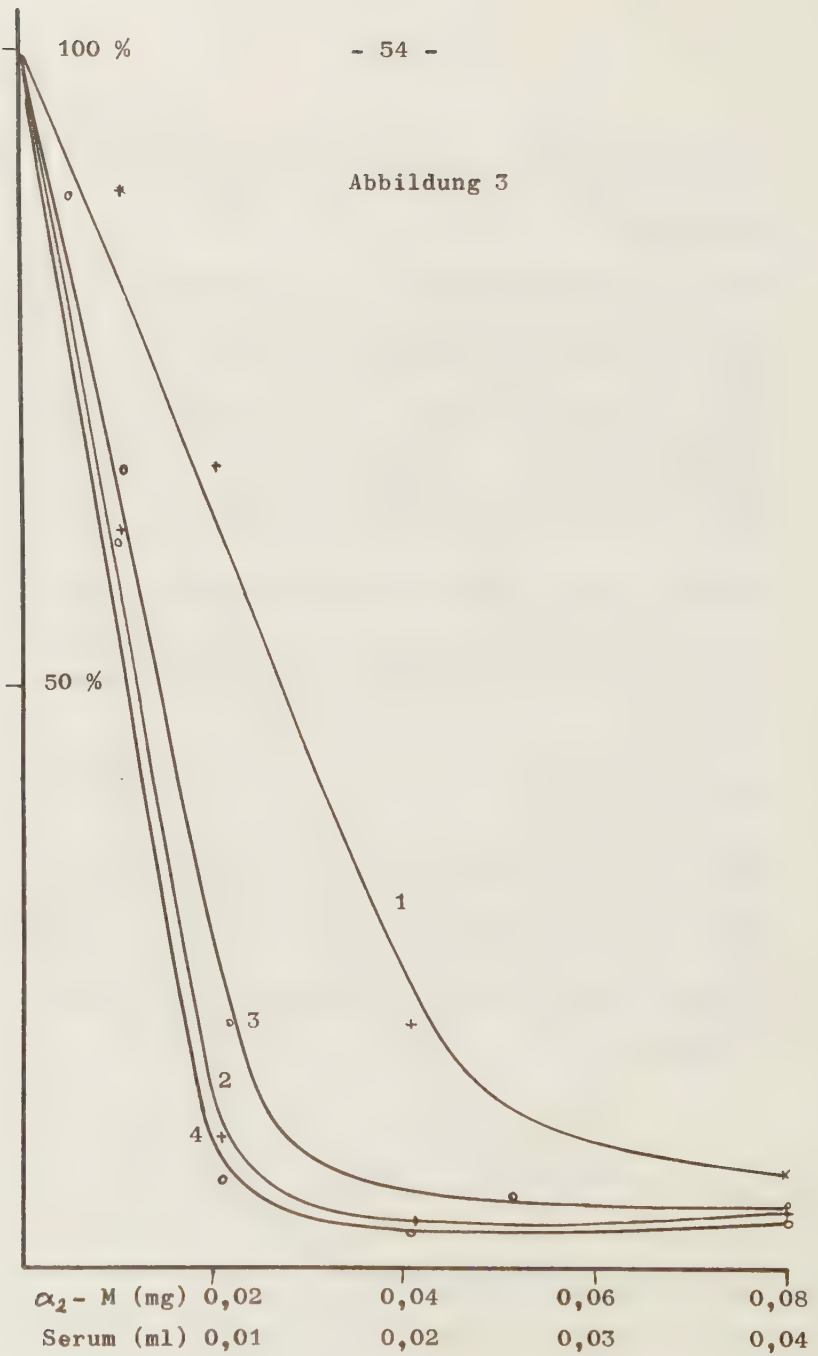
Die Kurven 1 und 2 geben die Verminderung der relativen Enzymaktivität der Proteasen aus *Pseudomonas aeruginosa* durch stetig steigende Volumina Humanserum wieder.

(Kurve 1: Serum mit α_2 -M Gehalt von 202 mg/100 ml

Kurve 2: " " " " " 114 ")

Nach Umrechnung ergeben sich die beiden Kurven 3 und 4. Sie zeigen die Verminderung der relativen Enzymaktivität in Beziehung zu den jeweils wirklich eingesetzten α_2 - M Mengen. Die Kurven 1 und 2 sind in die untereinander praktisch identischen Kurven 3 und 4 übergegangen.

Abbildung 3



Bei Patienten mit einer Pyocyaneus-Infektion konnten keine abnormen Werte des α_2 -M Spiegels im Serum festgestellt werden. Dagegen waren Schwankungen der Serum- α_2 -M Inhibitorkonzentration dieser Patienten im Immundiffusionsverfahren wie auch im Hemmtest innerhalb von 7 Tagen zwischen 152 mg/100ml und 224 mg/100ml nachweisbar.

Wenn es gelingt, die im lyophilisierten Kulturüberstand von *Pseudomonas aeruginosa* enthaltenen Proteasen näher zu charakterisieren und mittels synthetischer Substrate die Aktivitätsbestimmungen durchzuführen, können auch Angaben über die molaren Beziehungen zwischen dem Hemmeffekt des Seruminhibitors α_2 -M und der Wirkung der Proteasen der untersuchten Mikroorganismen gemacht werden.

E D I S K U S S I O N

Nachdem nun durch die beschriebenen Untersuchungen die praktisch vollständige Hemmung der Proteasen aus dem Kulturüberstand von *Pseudomonas aeruginosa* durch den Seruminhibitor α_2 -Makroglobulin nachgewiesen werden konnte, soll an dieser Stelle auch auf die diskutierten Möglichkeiten des Hemmechanismus von α_2 -M hingewiesen werden. Dieser Inhibitor wird nicht, wie eine große Menge Inhibitoren, als Protein-Proteinase Inhibitor angesehen. Im Gegensatz zu diesen, mit Proteasen kräftige und reversible Komplexe definierter Stöchiometrie bildenden Inhibitoren, die die enzymatischen Aktivitäten ganz und kompetitiv hemmen, wird das α_2 -M als Enzym-Träger-Protein oder Enzym-Spezifität-Änderer bezeichnet. Die Bindung von Enzymen an α_2 -M wird mit Verlust proteolytischer Aktivität des Enzyms diskutiert, selten aber mit dem Verlust, niedermolekulare Substanzen hydrolysieren zu können (30, 31).

Zusammen mit diesen Ergebnissen ist auch der vorgelegte Befund einer 25%igen Hemmung der bakteriellen Proteasen durch den säurestabilen niedermolekularen Inhibitor aus menschlichem Bronchialsekret für den Anwendungsbereich der Ergebnisse von Interesse.

In der Pathophysiologie der Erkrankungen der Atmungsorgane und des gesamten Respirationstraktes und im Hals-Nasen-Ohren-Bereich spielen die Befunde über proteolytische Prozesse eine zunehmend größere Rolle. Sie scheinen ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von obstruktiven Lungenemphysemen zu sein. Diese Beobachtungen werden belegt durch die Tatsache, daß infolge hereditären α_1 -AT-Mangels ohne Ausnahme die Bildung obstruktiver Lungenemphyseme nachzuweisen ist (36, 48, 49).

Bei pulmonalen und bronchialen Infekten, auch bei degenerativen Prozessen, fallen größere Mengen an Proteasen aus zerfallenden Leukozyten an. Kommt es nun nicht zu einer Hemmung, durch Ausfall des inhibierenden Systems, wird Lungenparenchym durch die erhöhte Proteolyse basischer Proteasen und Elastase angedaut. Auch Bronchiektasien können auf diesem Wege erzeugt werden.

Der neben α_1 -AT im Bronchialsekret gefundene niedermolekulare Inhibitor steht hierbei mit α_1 -AT in wechselseitiger Beziehung. Während der niedermolekulare Inhibitor zum Schutz der mit Flimmerepithel ausgekleideten Teile des Respirationstraktes ausreicht, aber in den Lungenalveolen fehlt, beruht dort der gesamte Schutzmechanismus auf α_1 -Antitrypsin.

Auch bei entzündlichen Rhinopathien konnten diese Zusammenhänge zwischen einem aus menschlichem Nasensekret gewonnenen niedermolekularen Inhibitor und

proteolytischer Aktivität studiert werden (18,19). Eine Ausprägung der genannten Krankheitsbilder trotz ausreichender α_1 -AT Konzentration im Serum und reichlicher Produktion des niedermolekularen Inhibitors durch die Schleimhäute, ist auf eine Erschöpfung und Überforderung der hemmenden Systeme zurückzuführen.

Obwohl aus den obengenannten Untersuchungen viele Wechselbeziehungen zwischen Proteolyse und inhibitorischen Systemen geklärt werden konnten, blieben doch einige Fragen offen. So konnte festgestellt werden, daß hochgereinigte Leukozytenproteasen durch α_1 -AT und den niedermolekularen Inhibitor vollständig gehemmt wurden. Im Gegensatz dazu blieben bei Hemmversuchen mit denselben Inhibitoren gegen pathologische Nasensekrete und purulente Sputen Restaktivitäten und nur in seltenen Fällen war bei diesen Untersuchungen eine vollständige Hemmung möglich (20, 46). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, daß es sich bei den Proteasen dieser Sekrete nur zum Teil um leukozytäre, oder mit ihnen artverwandte Proteasen handelte. Die Herkunft dieser Enzyme war nicht bekannt. Die Hemmkapazität der bekannten, natürlichen Proteaseninhibitoren, die im Bronchial-Nasen-Bereich nachgewiesen werden konnten, war dadurch überfordert. Die Folge dieser nicht hemmbaren proteolytischen Aktivität in den Sekreten ist durch eine negative Entwicklung des Krankheitsverlaufes mit ungünstiger Prognose gekennzeichnet.

Hier ergeben sich Parallelen zu den vorgelegten Befunden. Die gefundene Hemmbarkeit der Proteasen aus *Pseudomonas aeruginosa* durch den menschlichen niedermolekularen Bronchialsekretinhibitor betrug nur 25 %. Daraus ist ersichtlich, daß das Bakterium verschiedenartige Proteasen produziert, die durch diesen Inhibitor in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt werden können. Solche, von Mikroorganismen stammenden proteolytischen Enzyme können nun auch in den Bronchial- und Nasensekreten die nicht hemmbaren Aktivitäten verursachen. Speziell bei einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* konnte nun eine vollständige Hemmung durch den natürlichen Inhibitor α_1 -M erreicht werden, während derselbe Inhibitor leukozytäre Proteasen nur schwach zu hemmen vermag (16).

Die funktionelle Überforderung des natürlichen Hemmreservoirs bei entzündlichen Prozessen mit bakteriellen Infektionen, wie sie zu beobachten ist, scheint dazu aber einen Widerspruch zu bilden. Die Auflösung scheint nur so möglich, daß der sehr hochmolekulare Inhibitor α_1 -M mit einem Molekulargewicht von 820.000 die Schleimhaut-Schranke nur bedingt durchdringen kann. Das führt zu einer sehr geringen Konzentration in den Schleimhautsekreten, die nicht dazu ausreicht, die proteolytische Gewebeeruflösung und Einschmelzung einzudämmen.

Daß im Falle einer *Pyocyaneus*-Infektion nur selten eine Septicämie zu beobachten ist, mag auf die hohe Serumkonzentration von α_2 -Makroglobulin zurückzu-

führen sein. Untersuchungen, wie sie von MOSKOWITZ und HEINRICH veröffentlicht wurden, scheinen im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen sehr spekulativ (43). Der von ihnen beobachtete Abbau von α_1 -Antitrypsin durch die Kulturflüssigkeit von *Pseudomonas aeruginosa*, ließ sie von einem "Antitrypsininaktivator" sprechen. Die Pathogenität dieses Keimes führten sie auf diesen Faktor zurück. Sicherlich ist es jedoch richtig, eine Identität zwischen diesem Antitrypsininaktivator und den Proteasen des Keimes zu sehen.

Die Forderungen, die sich aus den vorgelegten Ergebnissen ableiten lassen, wären eine Untersuchung auch anderer bakterieller Proteasen auf ihre Hemmbarkeit durch α_2 - M und eine klinische Untersuchung dieses Inhibitors auf seine Verwendbarkeit in einer möglichen Antiproteinase-Therapie der *Pseudomonas aeruginosa* - Infektion.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Das Bakterium "Pseudomonas aeruginosa" erzeugt in reichem Maße extracelluläre Proteinasen, deren Wirkungsoptimum und größte Aktivität bei einem pH 7,8 und einer Temperatur von 37 Grad Celsius liegt. Diese Proteinasen sind praktisch vollständig hemmbar durch Seren vom Menschen, Rind und Schwein. Die Hemmwirkung von menschlichem Serum beruht auf dem natürlichen Proteinasen-Inhibitor α_2 -Makroglobulin. Andere Proteinasen-Inhibitoren des menschlichen Blutes, wie α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin, Inter- α -Trypsin Inhibitor zeigen keinerlei Wirkung. Eine 25%ige Hemmung kann auch durch den niedermolekularen, säurestabilen Inhibitor aus menschlichem Bronchialsekret erreicht werden. Dagegen bleiben weitere niedermolekulare Trypsin-Chymotrypsin Inhibitoren, wie der polyvalente Inhibitor aus Rinderorganen, der Inhibitor aus der Glandula Submandibularis des Hundes und der Inhibitor aus Keimen von Roggensamen inaktiv.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ABE, S., NAGAI, G.:

Biochim. Biophys. Acta 278, 1972, 125-132

2. BETHMANN, W., BIENENGRÄBER, A., ROSENTHAL, W.,:

Spezielle Zahn-Mund und Kiefer-Chirurgie
3.Aufl.,A.Barth Verlag-Leipzig 1971,179ff.

3. BÜCHNER, F.,:

Allgemeine Pathologie
Urban u.Schwarzenbg.Verlag Mü.1966, 398

4. CARNEY, S., A., DYSTER, JONES:

The invasion of burned skin by Pseud.aerug.
British J. of Dermatol. 88, 1973, 539

5. COLEBROOK, L.:

An new approach to the treatment of burns
and scalds.
Fine Technical Publ., London 1950

6. FORDOS, M.:

Recherches sur la matière colorante des
suppurations bleues : pyocyanine
C. R. Acad. Sci. 51, 1860, 215

7. FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.:

in: Methoden der Enzymatischen Analyse
(Hrsg. Bergmeyer, H. U.) 2. Aufl. 1970
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
Bd. 1, S. 1021

8. FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.:

in: Methoden der Enzymatischen Analyse
(Hrsg. Bergmeyer, H. U.) 2. Aufl. 1970
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
Bd. 1, S. 1221 - 1232

9. FRITZ, H., JAUMANN, E., MEISTER, R., PASQUAY, P.,
HOCHSTRASSER, K., FINK, E.:

Isolierung eines Inhibitors für Proteinase-
sen aus der Glandula Submandibularis vom
Hund.

Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhi-
bitors

W.de Gruyter Verlag, Berlin 1971, 257-270

10. GAUROT, P., O.:

Acta Chem. Scand. 20, 1966, 2299 - 2300

11. GESSARD, C.:

Sur les colorations bleue et verte des
linges à pausements

C. R. Acad. Sci. 94, 1882, 536

12. GRUMBACH, KIKUTH:

Die Infektionskrankheiten des Menschen
Thieme Verlag Stuttgart 1958, 140

13. HALLMANN, L.:

Bakteriologie und Serologie

Thieme Verlag Stuttgart 1955

14. HAMPERL, H.:

Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und
der Pathologischen Anatomie

Springer Verlag Berlin, 17. Aufl. 1944, 160ff.

15. HEIMBURGER, N.:

Proteinase Inhibition in Human Serum
in: Pulmonary Emphysema and Proteolysis
(Hrsg. Mittman Ch.) Academic Press,
New York and London 1972, 307

16. HERMANN, G., MIESCHER, F., A.:

Int. Arch. Allergy 27, 1965, 346

17. HOCHSTRASSER, K., WERLE, E.:

Isolierung eines Inhibitors aus Keimen
von Weizen und Roggen

Hoppe Seyler's Ztschr.f.Physiol.Chemie
Bd. 350, 1969, 249 - 254

18. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., WERLE, E.:

Der Proteinasen-Inhibitor-Spiegel im
menschlichen Nasensekret unter physiol.
und pathophysiolog. Bedingungen

Klin. Wochenschrift 49, 1971, 1234-1236

19. HOCHSTRASSER, K., HAENDLE, H., REICHERT, R.,
WERLE, E.:

Über Vorkommen und Eigenschaften eines
Proteinaseinhibitors im menschlichen
Nasensekret

Hoppe Seyler's Ztschr.f.Physiol.Chemie
Bd. 352, 1971, 954 - 958

20. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., MATZNER, M.,
WERLE, E.:

Hemmbarkeit proteolytischer Enzyme und
von Leukozytenproteasen durch den natür-
lichen Inhibitor des menschl.Nasensekrets
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10,
1972, 104 - 107

21. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S.,
WERLE, E.:

Isolierung und Charakterisierung eines
Proteinaseinhibitors aus menschl. Bron-
chialsekret

Hoppe Seyler's Z. f. Physiol. Chemie
Bd. 353, 1972, 221 - 226

22. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., WERLE, E.,
HAENDLE, H.:

New Proteinase Inhibitors in the
Secretion of some Mucous Membranes
of the Human Body/Protides of the Biolo-
gical Fluids - 20th Colloq.

Edition H.Peeters Oxford, New York 1973

23. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., HEIMBURGER, N.:
Antigenic Relationship between the Human
Bronchial Mucus Inhibitor and Plasma
Inter- α -Trypsin Inhib.
Hoppe Seyler's Ztschr. f. Physiol. Chemie
Bd. 354, 1973, 587 - 588
24. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S.,
WERLE, E.:
Detection and Isolation of a Second Acid
Stable Proteinase Inhib. from Human
Bronchial Mucus
Hoppe Seyler's Ztschr. f. Physio. Chemie
Bd. 354, 1973, 923 - 926
25. IWAMOTO, M., ABIKO, Y.:
Biochim. Biophys. Acta 214, 1970, 402-410
26. JOHNSON, G., G., MORRIS, J., M., BARK, R., S.:
The extracellular proteinase from Pseudo-
monas aeruginosa exhibiting Elastase
activity
Canadian J. of Microbiology Vol. 13,
1967, 711 - 719
27. KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
7. Aufl. Thieme Verlag Stuttgt. 1970,
59 ff., 129 ff.
28. KOJ., A., CHUDZIK, J., PAJDAK, W., DUBIN, A.:
Biochim. Biophys. Acta 268, 1972, 199-206
29. KUEPPERS, F., BEARN, A., G.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121,
1966, 1207 - 1209
30. LASKOWSKI, M., JR., SEALOCK, R., W.:
ProteinProteinase Inhibitors - Molekular
Aspects. in: The Enzymes (Hrsg. Boyer P.D.)
3. Aufl., Bd. 3/Acad. Press New York 1971, 375-473

31. LAURELL, C., B.:

Comparison of α_1 -AT and α_2 -M
in: Pulmonary Emphysema and Proteolysis
(Hrsg. Mittman Ch.) Academic Press
New York/London 1972

32. LEDDERHOSE, G.:

Über den blauen Eiter
Dtsch.Ztschr.f.Chir. 28, 1888, 201

33. LEONHARD, U.:

Pyorubin, a New Pigment produced by
Bac. Pyocyan.
Am. J. Hyg. 4, 1924, 404

34. LÜCKE, A.:

Die sogenannte blaue Eiterung und ihre
Ursachen
Arch. f. Klin. Chir. 3, 1862, 135

35. MEINKE, G., BARK, R., S.:

In Vivo studies with a toxic fraction of
Pseudomonas aeruginosa
Proc. of the Society f. Exp. Biol. and
Med. 135, 1970, 360 - 363

36. MITTMAN, Ch.:

Pulmonary Emphysema and Proteolysis
Academic Press New York and London 1972

37. MITSUHASHI, S., KOBAYASHI, F.:

Enzymatic inactivation of Gentamycin C
components by cell-free extract from
Pseudom. aerug.
J. Antibiot. 24, 1971, 400

38. MORIHARA, K.:

Protease of *Pseudomonas aeruginosa*
Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 20, 1956,
243-251/21, 1957, 11-17, 99-106/
23, 1959, 49-59/24, 1960, 467-473

39. MORIHARA, K.:

Production of Elastase and Proteinase by
Pseudomonas aeruginosa
J. of Bacteriol. 88, 1-3, 1964, 745

40. MORIHARA, K.:

Protease of *Pseudomonas aeruginosa*
Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 26, 842 - 847

41. MORIHARA, K.:

Pseudomonas aeruginosa Elastase
J. of Biol. Chem. 240, 3295 - 3303

42. MORIHARA, K.:

Pseudomonas aeruginosa Proteinase
Biochim. and Biophys. Acta 73, 1963, 113-131

43. MOSKOWITZ, W., HEINRICH, G.:

in: Pulmonary Emphysema and Proteolysis
(Hrsg. Mittman Ch.) Academic Press
New York/London 1972, 261 - 268

44. MUSZYNSKI, Z.:

Path. Microbiol. 39, 1973, 135 - 147

45. OHLSSON, K.:

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28,
1971, 225 - 229

46. RASCHE, B., ULMER, W., T.:

Exp. Med. 158, 1972, 229 - 246

47. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., WERLE, E.:

Nachweis eines niedermolekularen Proteasen-
inhibitors im menschl. Bronchialsekret
Ztschr. f. Laryngol. Rhinol. 51
Thieme Verlag Stuttgart. 1972, 190 - 193

48. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., CONRADI, G.:

Untersuchungen z. Proteasenhemmkapazität d.
menschl. Bronchialsekretes, Pneumonologie 147,
Springer Verlag 1972, 41 - 45

49. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K.:

Veränderungen des Proteaseninhibitorspiegels im menschl. Nasensekret im Verlauf versch. Rhinopathien
Ztschr. f. Laryngol. Rhinol. 51,
1972, 73 - 80

50. STANLEY, M., M.:

Bacillus Pyocyaneus Infections
Am. J. Med. 2, 1947, 253/347

51. VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I., WERLE E.:

Natürliche Proteinase-Inhibitoren
Thieme Verlag Stuttgt. 1966

52. WASSERMANN, A.:

Über eine epidemisch auftretende septische Nabelinfektion Neugeborener
Arch. f. pathol. Anatomie 165, 1901, 342

53. WICHER, V., DOLOVICH, J.:

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 40
1971, 779 - 788

54. YN, R., J., GRAPPEL, S., F., BLANK:

Experientia 28, 1972, 886 - 887

L E B E N S L A U F

Am 23. Juni 1949 wurde ich, Otto Martin Georg Brandl, in Göggingen bei Augsburg als Sohn der Verwaltungsbeamten Alfons Mayer (gest. 1951) und Johanna Brandl geboren.

Im Herbst 1956 trat ich in unserem Wohnort Augsburg in die Wittelsbacher Volksschule ein. Nach vierjährigem Besuch wechselte ich im Herbst 1960 in das Humanistische Gymnasium bei St. Anna in Augsburg über. Dort legte ich auch im Frühjahr 1969 die Reifeprüfung ab.

Im Herbst des gleichen Jahres trat ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Zahnmedizin an. Der naturwissenschaftlichen Vorprüfung unterzog ich mich nach dem Sommersemester 1970 und der zahnärztlichen Vorprüfung nach dem Wintersemester 1971/72. Vom 5. August 1974 bis 22. Januar 1975 legte ich das zahnmedizinische Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität in München ab.

Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Hochstrasser, Leiter des Biochemischen Laboratoriums der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München, bin ich zu großem Dank verpflichtet für seine Hilfe und Führung bei der Ausführung dieser Arbeit und das Überlassen eines Arbeitsplatzes seines Laboratoriums.

Ebenso schulde ich Dank Herrn Dr. H. M. Theopold für die Stellung des Themas und seine freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenleiden an der Universität München, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Herrn Dr. Bauernfeind vom Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie danke ich für die Unterstützung bei den Bakterien-Züchtungsversuchen.

Zum Schluß möchte ich es nicht versäumen, auch Frau S. Heindl für ihre freundliche Assistenz bei der Durchführung der Experimente und Frau L. Hampp für ihre wertvolle Schreibhilfe zu danken.

